

9

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. Mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/035876 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/40**,  
15/51, 15/88, C07K 14/18, 14/82, A61K 31/713, A61P  
31/14

**KREUTZER, Roland** [DE/DE]; Glotzdorf 26, 95466  
Weidenberg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11973

(74) **Anwalt: GASSNER, Wolfgang**; Nägelsbachstr. 49 A,  
91052 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
25. Oktober 2002 (25.10.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(30) **Angaben zur Priorität**:  
101 55 280.7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE  
101 58 411.3 29. November 2001 (29.11.2001) DE  
101 60 151.4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE  
PCT/EP02/00151 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP  
PCT/EP02/00152 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP  
102 35 621.1 2. August 2002 (02.08.2002) DE

(84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): RIBOPHARMA AG** [DE/DE]; Fritz-Hornschuch-  
Strasse 9, 95326 Kulmbach (DE).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): KREBS, Anja**  
[DE/DE]; Pretzfelder Str. 10, 90425 Nürnberg  
(DE). **JOHN, Matthias** [DE/DE]; Kapellenstr. 12,  
96103 Hallstadt (DE). **SCHUPPAN, Detlef** [DE/DE];  
Baumzeitel 2, 91088 Bubenreuth (DE). **LIMMER, Stefan**  
[DE/DE]; Gutenbergstr. 9, 95512 Neudrossenfeld (DE).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

WO 03/035876 A1

(54) **Title: USE OF A DOUBLE STRAND RIBONUCLEIC ACID FOR TREATING AN INFECTION WITH A POSITIVE-  
STRAND RNA-VIRUS**

(54) **Bezeichnung: VERWENDUNG EINER DOPPELSTRÄNGIGEN RIBONUKLEINSÄURE ZUR BEHANDLUNG EINER  
INFEKTION MIT EINEM (+)-STRANG-RNA-VIRUS**

(57) **Abstract: The invention relates to the use of a double strand ribonucleic acid (dsRNA) for treating an infection with a positive-  
strand RNA-virus, wherein a strand S1 of the dsRNA comprises a domain at least partially complementary of a segment of the  
translatable domain of the viral genome.**

(57) **Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behand-  
lung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren  
Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.**

**Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus**

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus und die Verwendung einer solchen Ribonukleinsäure zur Herstellung eines Medikaments, ein Medikament und ein Verfahren zur Hemmung der Replikation eines (+)-Strang-RNA-Virus.

10

Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist dabei komplementär zum Zielgen.

15

(+)-Strang-RNA-Viren weisen als Träger der genetischen Information eine RNA auf, an welcher im Zellinneren direkt eine Proteinsynthese stattfinden kann. Es ist somit keine Transkription erforderlich. Das Virusgenom wird abgesehen von einem 3'- und einem 5'-untranslatierten Bereich in seiner ganzen Länge in ein Polyprotein translatiert. Aus dem Polyprotein gehen durch Spaltungen die einzelnen, funktionell aktiven Struktur- und Nichtstrukturproteine hervor. Im viralen Genom schließen sich an die Sequenzen der Strukturproteine die Sequenzen der Nichtstrukturproteine an. Das Nichtstrukturprotein NS3 ist ein multifunktionelles Enzym mit einer Serinprotease-Domäne sowie NTPase- und Helikaseaktivität. Bisherige Therapieansätze zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus sind wenig erfolgreich und führen bei einem großen Teil der Infizierten zu keiner anhaltenden Besserung des Krankheitszustands.

20

25

30

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu vermeiden. Insbesondere soll eine wirksame Verwendung zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus bereitgestellt werden. Weiterhin soll  
5 ein Medikament zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus sowie eine Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments bereitgestellt werden. Weiterhin soll ein Verfahren zur Hemmung der Replikation eines (+)-Strang-RNA-Virus bereitgestellt werden.

10

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 16, 30 und 41 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 3 bis 15, 17 bis 29, 31 bis 40 und 42 bis 53.

15

Erfindungsgemäß ist eine Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus vorgesehen, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Be-  
20 reichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer solchen dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus.

25

Der Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms ist beliebig. Obwohl das Virusgenom für zahlreiche Proteine kodiert, ist es für eine Hemmung der Replikation des (+)-Strang-RNA-Virus überraschenderweise ausreichend, wenn eine  
30 dsRNA mit einem zu einem beliebigen Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms komplementären Strang S1 verwendet wird. Eine solche dsRNA kann durch RNA-Interferenz die Integrität des viralen RNA-Genoms dauerhaft zerstören.

Sie ist damit ideal zu einer Behandlung einer Infektion mit einem solchen Virus geeignet. Die Behandlung führt zu einer anhaltenden Besserung des Krankheitszustands.

- 5 Das (+)-Strang-RNA-Virus kann ein Hepatitis C-Virus (HCV) sein. Hier ist die Möglichkeit einer wirksamen Behandlung besonders bedeutend, da ein Impfschutz gegen Hepatitis C-Viren bisher nicht möglich ist. Eine HCV-Infektion kann beim Menschen zu schwerwiegenden Erkrankungen führen, insbesondere  
10 über eine chronische Hepatitis zu Leberzirrhose und Leberkrebs.

- In einer infizierten Zelle bewirkt die dsRNA, dass die (+)-Strang-RNA des (+)-Strang-RNA-Virus im Bereich des genannten  
15 Abschnitts enzymatisch geschnitten wird. Die in Ableserichtung der viralen RNA vor der Schnittstelle gelegenen Bereiche können dennoch translatiert werden und dabei zumindest teilweise zu funktionellen Proteinen führen. Die Expression dieser Proteine ist nicht zwangsläufig gehemmt. Bei einer vor-  
20 teilhaften Ausgestaltung des Verfahrens ist die dsRNA zur Hemmung der Expression eines vom Virusgenom kodierten Polyproteins geeignet. Die Hemmung kann dabei auch nur teilweise erfolgen, d.h. so, dass nur ein Teil des vollständigen Polyproteins exprimiert wird oder so, dass die Gesamtmenge des  
25 exprimierten Polyproteins reduziert wird.

- Vorzugsweise ist die dsRNA zur Hemmung der Expression einer funktionsfähigen vom Virusgenom kodierten Protease oder Helikase, insbesondere der HCV-NS3-Helikase, geeignet. Dazu kann  
30 der Abschnitt, zu welchem der Strang S1 der dsRNA komplementär ist, in Ableserichtung der viralen RNA vor oder in dem für die Helikase kodierenden Bereich des Virusgenoms angeordnet sein. Die Hemmung der Expression der viralen Helikase ist

überraschenderweise besonders vorteilhaft. Die Erfinder haben nämlich festgestellt, dass das Vorhandensein der viralen Helikase die replikationshemmende Wirkung der dsRNA reduziert. Durch die Hemmung der Expression der Helikase ist die Wirkung der dsRNA stärker als bei der Hemmung der Expression anderer viraler Proteine.

Der komplementäre Bereich der dsRNA kann weniger als 25, insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur ist besonders effizient in der Behandlung der Virus-Infektion und insbesondere in der Hemmung der Replikation des Virus. Der Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare. Eine solche dsRNA ist intrazellulär besonders beständig.

Vorzugsweise weist die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf. Einzelsträngige Überhänge verringern die Stabilität der dsRNA in Blut, Serum und Zellen und verstärken gleichzeitig die replikationshemmende Wirkung der dsRNA. Besonders vorteilhaft ist es, wenn die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist. Das andere Ende ist dann bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass zur Verstärkung der replikationshemmenden Wirkung der dsRNA ein Überhang an einem Ende der dsRNA ausreichend ist, ohne dabei die Stabilität in einem solchen Maße zu erniedrigen wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen

Zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als hinreichend beständig und besonders Wirksam erwiesen. Die Hemmung der Replikation der Viren ist besonders effektiv, wenn sich der Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

- 5 Vorzugsweise weist die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 auf, d.h. sie ist aus zwei Einzelsträngen gebildet. Besonders wirksam ist die dsRNA, wenn der Strang S1 (Antisinn-Strang) eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen  
10 aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA ist dabei glatt ausgebildet.

- Die dsRNA kann in einer Zubereitung vorliegen, die zur Inha-  
15 lation, oralen Aufnahme, Infusion und Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Die Zubereitung kann dabei, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung  
20 oder einem physiologisch verträglichen Puffer, und der dsRNA bestehen. Der physiologisch verträgliche Puffer kann eine phosphatgepufferte Salzlösung sein. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einem solchen Lösungsmittel oder einem solchen Puffer gelöste  
25 und verabreichte dsRNA von Zellen aufgenommen wird und die Expression eines Zielgens bzw. Replikation eines Virus hemmt, ohne das die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss.

- 30 Vorzugsweise liegt die dsRNA in einer physiologisch verträglichen Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem

Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vor. Der physiologisch verträgliche Puffer kann eine phosphatgepufferte Salzlösung sein. Eine micellare Struktur, ein Virus-Kapsid, ein Kapsoid oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel kann die Aufnahme der dsRNA in infizierte Zellen erleichtern. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel besteht aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymer, z.B. Polybutylcyanoacrylat. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel kann darin enthaltene oder daran gebundene dsRNA im Körper transportieren und freisetzen. Die dsRNA kann oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser oder intraperitonealer Infusion oder Injektion, verabreicht bzw. eingenommen werden.

Vorzugsweise wird die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag verwendet. Es hat es sich nämlich gezeigt, dass die dsRNA bereits in dieser Dosierung eine ausgezeichnete Effektivität in der Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus aufweist.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Medikament zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus, wobei das Medikament eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält, deren einer Strang S1 einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist. Vorzugsweise liegt das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vor, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg,

bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht. Die Verabreichungseinheit kann für eine einmalige Verabreichung bzw. Ein-  
5 nahme pro Tag konzipiert sein. Dann ist die gesamte Tagesdosis in einer Verabreichungseinheit enthalten. Ist die Verabreichungseinheit für eine mehrmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert, so ist die dsRNA darin in einer entsprechend geringeren das Erreichen der Tagesdosis ermögli-  
10 chenden Menge enthalten. Die Verabreichungseinheit kann auch für eine einzige Verabreichung bzw. Einnahme für mehrere Tage konzipiert sein, z. B. indem die dsRNA über mehrere Tage freigesetzt wird. Die Verabreichungseinheit enthält dann ein entsprechend Mehrfaches der Tagesdosis.

15 Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Verfahren zur Hemmung der Replikation eines (+)-Strang-RNA-Virus in einer Zelle vorgesehen, wobei mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird und wobei ein Strang S1  
20 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist. Die Erfindung betrifft außerdem eine dsRNA, deren einer Strang S1 einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Genoms eines (+)-Strang-RNA-  
25 Virus zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Medikaments, des erfindungsgemäßen Verfahrens  
30 und der erfindungsgemäßen dsRNA wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen. Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnung beispielhaft erläutert.



Fig. 1 zeigt eine grafische Darstellung der Reduktion der HCV-RNA im HCV-Replikon-Modell durch Transfektion von NS3-spezifischer dsRNA.

5 HCV weist ein Genom von ca. 9600 Nukleotiden auf. Es kodiert für die Strukturproteine C, E1 und E2 und für die Nicht-Strukturproteine NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a und NS5b. Da molekularbiologische Analysen mit HCV in Zellkultur sehr schwierig sind, wird die Wirkung der dsRNA auf virale Gense-

10 quenzen anhand eines nicht pathogenen Ersatzsystems untersucht. Hierzu ist der für die Strukturproteine C, E1 und E2 kodierende Teil des viralen Genoms durch eine Neomycin-Resistenz vermittelnde Neomycinkassette ersetzt worden. Das modifizierte virale Genom ist mit der Gene Accession Number

15 AJ242654 beim National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, USA registriert. Es ist in HuH-7-Leberzellen (JCRB0403, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1,

20 Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan) transfiziert worden. Es repliziert in diesen Zellen in Gegenwart des Neomycin-Analogen G418 ohne infektiöse Partikel entstehen zu lassen. Das die stabile Replikation des modifizierten HCV-Genoms ermöglichende System (Lohmann et al. Science 285, (1999), Seite 110)

25 wird auch als "Replikon-Modell" für Hepatitis C-Viren bezeichnet.

Die eingesetzten dsRNAs weisen folgende, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:4 bezeichneten Sequenzen auf:

30 dsRNA1, welche einer Sequenz aus dem für NS3 kodierenden Bereich entspricht:

S2: 5'- AGA CAG UCG ACU UCA GCC UGG-3' (SEQ ID NO: 1)

S1: 3'-GG UCU GUC AGC UGA AGU CGG A -5' (SEQ ID NO: 2)

5 dsRNA2, welche als Negativkontrolle ohne Beziehung zur Sequenz von NS3 der Sequenz der Nukleotide 886-909 des Vektors pEGFP-C1, Accession Number U55763, NCBI entspricht:

S2: 5'- CUA CGU CCA GGA GCG CAC CA UC -3' (SEQ ID NO: 3)

S1: 3'- CC GAU GCA GGU CCU CGC GUG GU AG -5' (SEQ ID NO: 4)

10

S2 stellt dabei jeweils den Sinn-Strang und S1 den Antisinn-Strang dar, d.h. die Sequenz des Strangs S2 ist identisch mit der entsprechenden Sequenz aus dem HCV.

15 Die HuH-7-Zellen werden in Gegenwart von 1 mg/ml des Antibiotikums G418 in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium mit 20 % fötalem Kälberserum kultiviert. Zur Transfektion wurden 80000 Zellen pro Vertiefung (3,5 cm Durchmesser) einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium ausgesät. Als Transfektionshilfe  
 20 wurde "Fugene 6" (Katalog-Nummer 1814443) der Firma Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim entsprechend der zugehörigen Arbeitsvorschrift eingesetzt. Dazu wurden in einem Reaktionsgefäß 100 µl serumfreies Medium (SFM) mit 5 µl Fugene 6-Reagenz gemischt und 5 min bei RT in-  
 25 kubiert. In einem weiteren Gefäß wurden jeweils 3 µg dsRNA2 (entspricht ca. 0,1 µmol/l finale Konzentration dsRNA2), 3 µg dsRNA1 (entspricht ca. 0,1 µmol/l finale Konzentration dsRNA1), 1,5 µg dsRNA1 plus 1,5 µg dsRNA2 (entspricht ca. 0,05 µmol/l finale Konzentration dsRNA1) oder 300 ng dsRNA1  
 30 plus 2,7 µg dsRNA2 (entspricht ca. 0,01 µmol/l finale Konzentration dsRNA1) vorgelegt. Die Stammkonzentrationen der dsRNA1 und dsRNA2 betrug jeweils 20 µM (entspricht ca. 300 ng/µl). Das Gemisch aus Fugene 6 und SFM wurde tropfenweise zu den Nukleinsäuren gegeben, mit einer Pipettenspitze vor-

sichtig gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transfektion wurde der Reaktionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Jede Transfektion wurde mindestens im Doppelansatz durchgeführt und in mindestens 2 unabhängigen Experimenten verifiziert.

Die Wirkung der dsRNA auf die Replikation des modifizierten HCV Genoms wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Etwa 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen dazu aufgeschlossen und die enthaltene RNA mit dem Kit PeqGold RNAPure der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2 b, D-91052 Erlangen, Bestell Nummer 30-1010, gemäß Hersteller-vorschrift isoliert.

Anschließend wurden gleiche RNA-Mengen (100-1000 ng) zur Reversen Transkription mittels Superscript II der Firma Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, D-76131 Karlsruhe, Katalog-Nummer 18064-014 eingesetzt. Als Primer wurden 100 pmol Oligo-dT-Primer bzw. 50 pmol random Primer verwendet. 10 µl RNA (100-1000 ng), 0,5 µl Oligo dT-Primer (100 pmol) und 1 µl random Primer (50 pmol) wurden 10 min bei 70°C inkubiert und dann kurz auf Eis gelagert. Anschließend sind 7 µl Reverse Transkriptase-Mix (4 µl 5 x Puffer; 2 µl 0,1 mol/l DTT; 1 µl je 10mmol/l dNTP), 1 µl Superscript II und 1 µl des Ribonuklease Inhibitors RNasin® der Firma Promega GmbH, Schildkrötstr. 15, D-68199 Mannheim zugesetzt worden. Das Gemisch ist für 10 min bei 25°C, dann für 1 Stunde bei 42°C und abschließend für 15 min bei 70°C gehalten worden.

Von gleichen Volumina der gebildeten cDNA wurden im "Light-Cycler" der Firma Roche Diagnostics GmbH gemäß dem "TaqMan"-Verfahren der Firma PerkinElmer, Ferdinand-Porsche-Ring 17,

D-63110 Rodgau-Jügesheim, nach Herstellerangaben mittels des LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes -Kits der Firma Roche Diagnostics GmbH spezifische cDNA-Mengen quantifiziert. Die Detektion erfolgt über eine mit dem  
 5 Fluorophor 6'-FAM (Carboxyfluorescein) am 5'-Ende und dem Löschmolekül TAMRA (Carboxy-tetra-methyl-Rhodamin) am 3'-Ende markierte Sonde. Dabei wird das Fluorophor mit Licht angeregt und überträgt die Anregungsenergie auf das in unmittelbarer  
 10 Nähe befindliche 3'-seitige Löschmolekül. Während der jeweiligen Extensionsphasen der PCR Reaktion führt die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq DNA Polymerase zur Hydrolyse der Sonde und damit zur räumlichen Trennung des Fluorophors vom Löschmolekül. Die Fluoreszenz von 6'-FAM wird immer weniger gelöscht. Sie nimmt daher zu und wird quantitativ erfasst.

15 Zur Quantifizierung von HCV NS3-cDNA kamen zum Einsatz:

NS3-Sonde: 5'-CAT TGT CGT AGC AAC GGA CGC TCT AAT GAC-3' (SEQ ID NO 5)

20 NS3 Primer: 5'-CCT TGA TGT ATC CGT CAT ACC AAC TAG-3' (SEQ ID NO 6)

25 NS3 Reverse Primer: 5'-TGA GTC GAA ATC GCC GGT AA-3' (SEQ ID NO 7)

Weiterhin wurde  $\beta$ 2-Mikroglobulin-cDNA als Standard quantifiziert.  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2-MG) ist ein konstitutiv in konstanter Menge exprimiertes Protein. Zur Quantifizierung kamen  
 30 zum Einsatz:

$\beta$ 2-Mikroglobulin-Sonde: 5'-AAC CGT CAC CTG GGA CCG AGA CAT GTA-3' (SEQ ID NO 8)

β2-Microglobulin Primer: 5'-CCG ATG TAT ATG CTT GCA GAG TTA  
A-3' (SEQ ID NO 9)

β2-Microglobulin Reverse Primer: 5'-CAG ATG ATT CAG AGC TCC  
5 ATA GA-3' (SEQ ID NO 10)

Die NS3-Sonde und die β2-Microglobulin-Sonde wiesen jeweils  
am 5'-Ende eine FAM-Markierung und am 3'-Ende eine TAMRA-  
Markierung auf.

10

Die Menge an HCV NS3-cDNA wurde als Verhältnis zur Menge von  
β2-MG-cDNA bestimmt und graphisch in Fig. 1 dargestellt.  
"pEGFP" stellt den durch ausschließliche Transfektion mit  
dsRNA2 (Kontrolle) ermittelten Wert und "HCV 0,1 μmol/l",  
15 "HCV 0,05 μmol/l" und "HCV 0,01 μmol/l" die durch Transfektio-  
on mit jeweils 0,1 μmol/l, 0,05 μmol/l und bei 0,01 μmol/l  
NS3-spezifischer dsRNA1 ermittelten Werte dar.

Die Transfektion mit dsRNA1 führte bei 0,1 μmol/l, 0,05  
20 μmol/l und bei 0,01 μmol/l finaler Konzentration im Medium zu  
einer etwa 60-fachen Hemmung im Vergleich zur Transfektion  
mit der unspezifischen Kontrolle dsRNA2.

## Patentansprüche

1. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.  
5
2. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-Strang-RNA-Virus, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.  
10
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis C-Virus (HCV) ist.  
15
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zur Hemmung der Expression eines vom Virusgenom kodierten Polyproteins geeignet ist.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zur Hemmung der Expression einer funktionsfähigen vom Virusgenom kodierten Protease oder Helikase, insbesondere der HCV-NS3-Helikase, geeignet ist.  
20
6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Abschnitt in Ableserichtung der viralen RNA vor oder in dem für eine Helikase, insbesondere die HCV-NS3-Helikase, kodierenden Bereich des Virusgenoms angeordnet ist.  
25
7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich weniger als 25, insbesondere 19  
30

bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.

8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
5 der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
10 die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die dsRNA den Überhang  
ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
15 die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende  
20 des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
25 die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
30 die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiolo-

gisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphat-  
gepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

14. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
die dsRNA in einer physiologisch verträglichen Lösung,  
5 insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer  
oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer  
micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem  
Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano-  
oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren  
10 Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbe-  
sondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, be-  
sonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höch-  
15 stens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körper-  
gewicht und Tag verwendet wird.
16. Medikament zur Behandlung einer Infektion mit einem (+)-  
Strang-RNA-Virus, wobei das Medikament eine doppelsträn-  
gige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält, deren einer Strang  
20 S1 einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs  
des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären  
Bereich aufweist.
17. Medikament nach Anspruch 16, wobei das (+)-Strang-RNA-  
Virus ein Hepatitis C-Virus (HCV) ist.
- 25 18. Medikament nach Anspruch 16 oder 17, wobei die dsRNA zur  
Hemmung der Expression eines vom Virusgenom kodierten Po-  
lyproteins geeignet ist.
19. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei die  
dsRNA zur Hemmung der Expression einer funktionsfähigen  
30 vom Virusgenom kodierten Protease oder Helikase, insbe-  
sondere der HCV-NS3-Helikase, geeignet ist.



20. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei der Abschnitt in Ableserichtung der viralen RNA vor oder in dem für eine Helikase, insbesondere die HCV-NS3-Helikase, kodierenden Bereich des Virusgenoms angeordnet ist.
- 5 21. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei der komplementäre Bereich weniger als 25, insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
- 10 22. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
- 15 23. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 22, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
24. Medikament nach Anspruch 23, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
- 20 25. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 24, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
- 25 26. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 25, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
- 30

27. Medikament nach Anspruch 26, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichem Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
28. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 27, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
29. Medikament nach einem der Ansprüche 16 bis 28, wobei das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vorliegt, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht.
30. Verfahren zur Hemmung der Replikation eines (+)-Strang-RNA-Virus in einer Zelle, wobei mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird und wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Virusgenoms zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.
31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei das (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis C-Virus ist.
32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, wobei die Expression eines vom Virusgenom kodierten Polyproteins gehemmt wird.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 32, wobei die Expression einer funktionsfähigen vom Virusgenom kodierten Protease oder Helikase, insbesondere der HCV-NS3-Helikase, gehemmt wird.
- 5 34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei der Abschnitt in Ableserichtung der viralen RNA vor oder in dem für eine Helikase, insbesondere die HCV-NS3-Helikase, kodierenden Bereich des Virusgenoms angeordnet ist.
- 10 35. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 34, wobei der komplementäre Bereich weniger als 25, insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
- 15 36. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 35, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
- 20 37. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 36, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
- 25 39. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 38, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.
- 30

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 39, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.
41. Doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA), deren einer Strang S1 einen zu einem Abschnitt des translatierbaren Bereichs des Genoms eines (+)-Strang-RNA-Virus zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist.
42. DsRNA nach Anspruch 41, wobei das (+)-Strang-RNA-Virus ein Hepatitis C-Virus (HCV) ist.
43. DsRNA nach Anspruch 41 oder 42, wobei die dsRNA zur Hemmung der Expression eines vom Virusgenom kodierten Polyproteins geeignet ist.
44. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 43, wobei die dsRNA zur Hemmung der Expression einer funktionsfähigen vom Virusgenom kodierten Protease oder Helikase, insbesondere der HCV-NS3-Helikase, geeignet ist.
45. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 44, wobei der Abschnitt in Ableserichtung der viralen RNA vor oder in dem für eine Helikase, insbesondere die HCV-NS3-Helikase, kodierenden Bereich des Virusgenoms angeordnet ist.
46. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 45, wobei der komplementäre Bereich weniger als 25, insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
47. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 46, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25,

besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.

48. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei die dsRNA  
 5 zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.

49. DsRNA nach Anspruch 48, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.

10 50. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 49, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist und der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen  
 15 Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.

51. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 50, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Infusion oder Injektion, geeignet ist.  
 20

52. DsRNA nach Anspruch 51, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen  
 25 Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

53. DsRNA nach einem der Ansprüche 41 bis 52, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise  
 30

einem Liposom, einem Virus-Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.

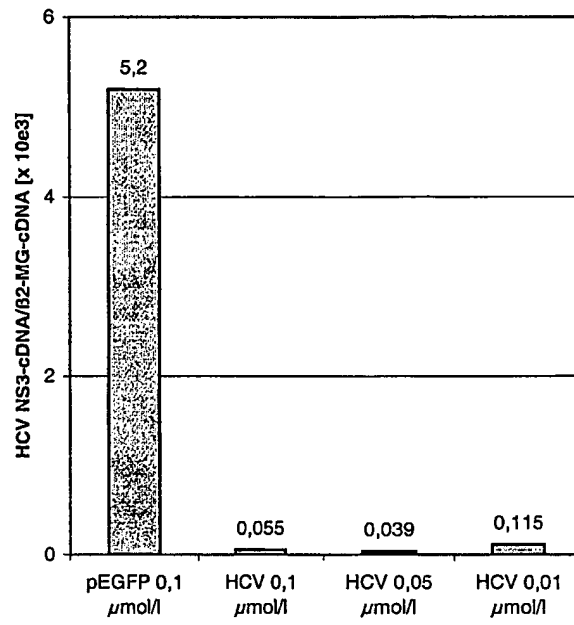


Fig. 1

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Ribopharma AG

5 <120> Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur  
Behandlung einer Infektion mit einem  
(+)-Strang-RNA-Virus

10 <130> 422328EH  
<140>  
<141>

15 <160> 10

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 21  
20 <212> RNA  
<213> Hepatitis C virus

<400> 1  
25 agacagucga cuucagccug g 21

<210> 2  
<211> 21  
<212> RNA  
30 <213> Hepatitis C virus

<400> 2  
aggcugaagu cgacugucug g 21

35 <210> 3  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Vektor

<400> 3  
45 cuacguccag gagcgacca uc 22

<210> 4  
<211> 24  
50 <212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Vektor

55 <400> 4  
gauggugcgc uccuggacgu agcc 24

60 <210> 5  
<211> 30



<212> DNA  
 <213> Hepatitis C virus  
  
 <400> 5  
 5 cattgtcgta gcaacggacg ctctaatac 30  
  
 <210> 6  
 <211> 27  
 10 <212> DNA  
 <213> Hepatitis C virus  
  
 <400> 6  
 15 ccttgatgta tccgtcatat caactag 27  
  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 20 <213> Hepatitis C virus  
  
 <400> 7  
 tgagtcgaaa tcgccggtaa 20  
  
 25  
 <210> 8  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 30  
 <400> 8  
 aaccgtcacc tgggaccgag acatgta 27  
  
 35 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 40 <400> 9  
 ccgatgtata tgcttgaga gttaa 25  
  
 45 <210> 10  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 10  
 50 cagatgattc agagctccat aga 23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No  
PCT/EP 02/11973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/40 A61K31/713	C12N15/51 A61P31/14
C12N15/88	C07K14/18	C07K14/82
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MCCAFFREY ANTON P ET AL: "RNA interference in adult mice." NATURE. ENGLAND 4 JUL 2002, vol. 418, no. 6893, 4 July 2002 (2002-07-04), pages 38-39, XP002234152 ISSN: 0028-0836	1-4, 7, 8, 12-18, 21, 22, 26-32, 35, 36, 40-43, 46, 47, 51-53
Y	the whole document	9-11, 23-25, 37-39, 48-50
<div style="text-align: center;">--- -/--</div>		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 March 2003		27/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Armandola, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ternational Application No  
PCT/EP 02/11973

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3 August 2000 (2000-08-03)  the whole document ---	1,2,4,7, 8,12-16, 18,21, 22, 26-30, 32,35, 36,40, 41,43, 46,47, 51-53
Y	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW ()) 1 July 1999 (1999-07-01)  the whole document ---	1,2,4, 12,16, 18, 26-30, 32,40, 41,51-53
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11 October 2001 (2001-10-11)  the whole document ---	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53
P,Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6 June 2002 (2002-06-06)  the whole document ---	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 101, no. 1, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 the whole document ---	1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53
P,Y	JACQUE JEAN-MARC ET AL: "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." NATURE. ENGLAND 25 JUL 2002, vol. 418, no. 6896, 25 July 2002 (2002-07-25), pages 435-438, XP002232889 ISSN: 0028-0836 the whole document ---	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53
-/--		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/11973

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 101, no. 3, 28 April 2000 (2000-04-28), pages 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674</p> <p>the whole document</p>	<p>1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53</p>
Y	<p>ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, vol. 15, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369</p> <p>the whole document</p>	<p>1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53</p>
Y	<p>CAPLEN N J ET AL: "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 14 AUG 2001, vol. 98, no. 17, 14 August 2001 (2001-08-14), pages 9742-9747, XP002232936 ISSN: 0027-8424</p> <p>the whole document</p>	<p>1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53</p>
P,Y	<p>BITKO V ET AL: "Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses." BMC MICROBIOLOGY 'ELECTRONIC RESOURCE!'. ENGLAND 2001, vol. 1, no. 1, 2001, page 34 XP002232991 ISSN: 1471-2180</p> <p>the whole document</p>	<p>1-4, 7-18, 21-32, 35-43, 46-53</p>
A	<p>PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 6, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP02/11973

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although Claims 1-15 and 30-40 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 02/11973

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0044895	A	03-08-2000	DE 19956568 A1	17-08-2000
			AT 222953 T	15-09-2002
			AU 3271300 A	18-08-2000
			CA 2359180 A1	03-08-2000
			WO 0044895 A1	03-08-2000
			DE 10080167 D2	28-02-2002
			DE 50000414 D1	02-10-2002
			EP 1144623 A1	17-10-2001
			EP 1214945 A2	19-06-2002
			JP 2003502012 T	21-01-2003
WO 9932619	A	01-07-1999	US 6506559 B1	14-01-2003
			AU 743798 B2	07-02-2002
			AU 1938099 A	12-07-1999
			CA 2311999 A1	01-07-1999
			EP 1042462 A1	11-10-2000
			JP 2002516062 T	04-06-2002
			WO 9932619 A1	01-07-1999
WO 0175164	A	11-10-2001	AU 3574402 A	11-06-2002
			AU 4962201 A	15-10-2001
			WO 0244321 A2	06-06-2002
			WO 0175164 A2	11-10-2001
			US 2002086356 A1	04-07-2002
WO 0244321	A	06-06-2002	AU 3574402 A	11-06-2002
			AU 4962201 A	15-10-2001
			WO 0244321 A2	06-06-2002
			WO 0175164 A2	11-10-2001
			US 2002086356 A1	04-07-2002

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11973

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/40 C12N15/51 C12N15/88 C07K14/18 C07K14/82  
A61K31/713 A61P31/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	MCCAFFREY ANTON P ET AL: "RNA interference in adult mice." NATURE. ENGLAND 4 JUL 2002, Bd. 418, Nr. 6893, 4. Juli 2002 (2002-07-04), Seiten 38-39, XP002234152 ISSN: 0028-0836	1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53
Y	das ganze Dokument	9-11, 23-25, 37-39, 48-50



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. März 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/03/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Armandola, E

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11973

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3. August 2000 (2000-08-03)  das ganze Dokument	1,2,4,7, 8,12-16, 18,21, 22, 26-30, 32,35, 36,40, 41,43, 46,47, 51-53
Y	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW ( ) 1. Juli 1999 (1999-07-01)  das ganze Dokument	1,2,4, 12,16, 18, 26-30, 32,40, 41,51-53
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11. Oktober 2001 (2001-10-11)  das ganze Dokument	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53
P,Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6. Juni 2002 (2002-06-06)  das ganze Dokument	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 101, Nr. 1, 31. März 2000 (2000-03-31), Seiten 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument	1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53
P,Y	JACQUE JEAN-MARC ET AL: "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." NATURE. ENGLAND 25 JUL 2002, Bd. 418, Nr. 6896, 25. Juli 2002 (2002-07-25), Seiten 435-438, XP002232889 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument	1,2,4, 7-16,18, 21-30, 32, 35-41, 43,46-53
	---	

-/--



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11973

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
Y	<p>BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 101, Nr. 3, 28. April 2000 (2000-04-28), Seiten 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674</p> <p>das ganze Dokument</p>	<p>1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53</p>
Y	<p>ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, Bd. 15, Nr. 2, 15. Januar 2001 (2001-01-15), Seiten 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369</p> <p>das ganze Dokument</p>	<p>1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53</p>
Y	<p>CAPLEN N J ET AL: "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 14 AUG 2001, Bd. 98, Nr. 17, 14. August 2001 (2001-08-14), Seiten 9742-9747, XP002232936 ISSN: 0027-8424</p> <p>das ganze Dokument</p>	<p>1-4,7,8, 12-18, 21,22, 26-32, 35,36, 40-43, 46,47, 51-53</p>
P,Y	<p>BITKO V ET AL: "Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses." BMC MICROBIOLOGY 'ELECTRONIC RESOURCE!'. ENGLAND 2001, Bd. 1, Nr. 1, 2001, Seite 34 XP002232991 ISSN: 1471-2180</p> <p>das ganze Dokument</p>	<p>1-4, 7-18, 21-32, 35-43, 46-53</p>
A	<p>PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 6, Nr. 5, November 2000 (2000-11), Seiten 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ernationales Aktenzeichen  
PCT/EP 02/11973

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
Obwohl die Ansprüche 1-15 und 30-40 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In tionales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11973

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0044895 A	03-08-2000	DE 19956568 A1	17-08-2000
		AT 222953 T	15-09-2002
		AU 3271300 A	18-08-2000
		CA 2359180 A1	03-08-2000
		WO 0044895 A1	03-08-2000
		DE 10080167 D2	28-02-2002
		DE 50000414 D1	02-10-2002
		EP 1144623 A1	17-10-2001
		EP 1214945 A2	19-06-2002
		JP 2003502012 T	21-01-2003
WO 9932619 A	01-07-1999	US 6506559 B1	14-01-2003
		AU 743798 B2	07-02-2002
		AU 1938099 A	12-07-1999
		CA 2311999 A1	01-07-1999
		EP 1042462 A1	11-10-2000
		JP 2002516062 T	04-06-2002
		WO 9932619 A1	01-07-1999
WO 0175164 A	11-10-2001	AU 3574402 A	11-06-2002
		AU 4962201 A	15-10-2001
		WO 0244321 A2	06-06-2002
		WO 0175164 A2	11-10-2001
		US 2002086356 A1	04-07-2002
WO 0244321 A	06-06-2002	AU 3574402 A	11-06-2002
		AU 4962201 A	15-10-2001
		WO 0244321 A2	06-06-2002
		WO 0175164 A2	11-10-2001
		US 2002086356 A1	04-07-2002